

Nachwuchswissenschaftlerforum 2009

Stichwörter: Weizen (*Triticum aestivum* L.), *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*, *Oculimacula* spp., *Fusarium culmorum*, *Puccinia trititica*, Barley yellow dwarf Virus, PI583794, PI611939, STSJ15, 2P1/2P2

Abstract

In order to broaden the genetic base in *Triticum aestivum* against economically important pathogens (*Oculimacula* spp., *Fusarium culmorum*, *Puccinia trititica* and Barley yellow dwarf virus) wheat translocation lines carrying a chromosomal segment derived from *Thinopyrum* spp are tested for resistance and analyzed by molecular techniques. Two introgression lines PI583794 and PI611939 as carriers of the *Thinopyrum*-fragment, as well as 3 wheat cultivars (Boomer, Esket and Mirage) are used for a marker-assisted back crossing program. For the phenotypic characterization, these lines were tested for resistance against these above mentioned pathogens. In addition to the genotypic characterization was carried out using *Thinopyrum* specific primers STSJ15 and 2P1/2P2 to identify the introgression.. To define the size of the introgressions-fragments selected genotypes of the BC₁F₁ and BC₂F₁ were tested with polymorphic microsatellites (SSRs) in order to identify those genotypes carrying only a small fragment of *Thinopyrum* spp. but still being resistant.

Keywords: wheat (*Triticum aestivum* L.), *Thinopyrum intermedium*, *Thinopyrum ponticum*, *Oculimacula* spp., *Fusarium culmorum*, *Puccinia trititica*, Barley yellow dwarf, PI583794; PI611939, STSJ15, 2P1/2P2

Danksagung: Die Autoren danken dem BMELV sowie RAGT 2n für die finanzielle Unterstützung des Projektes im Rahmen der Innovationsförderung (28-1-43.010-07).

Bartelmann, Anne^{1,2}; Balko, Christiane²; Seddig, Sylvia²

¹ FU-Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie, Berlin; ² Julius Kühn-Institut, Institut für Resistenzforschung und Stresstoleranz, Versuchsstation für Kartoffelforschung, OT Groß Lüsewitz, Sanitz

Evaluierung von Kartoffelgenotypen bezüglich Trockentoleranz

Evaluation of potato genotypes regarding drought tolerance

Zusammenfassung

Zur Identifizierung und Validierung von Kandidatengen für die Trockentoleranz in Kartoffeln wurden 40 *S. tuberosum*-Genotypen in einem Gefäßversuch unter einem Rain-out Shelter unter Kontroll- und Trockenstressbedingungen evaluiert. Je Genotyp wurden 24 *in vitro*-Pflanzen in 51 Töpfen bis zum Beginn der Knollenbildung unter Kontrollbedingungen kultiviert. Danach wurden die Pflanzen Trockenstress (20 Tage kein Wasser) ausgesetzt bzw. als Kontrolle weiterhin optimal bewässert. Probenahmen von Blättern in den Stress- und Kontrollpflanzen ermöglichten die Bestimmung spezifischer Inhaltsstoffe zu sechs verschiedenen Zeitpunkten. Weiterhin wurden etwa 50 Kandidatengen-Primerpaare für eine Expressionsanalyse mittels Realtime RT-PCR entwickelt. Die nach Beendigung der Stressphase unter Kontrollbedingungen bis zur Ernte kultivierten Kartoffelgenotypen wurden hinsichtlich phänotypischer Merkmale evaluiert. Nach der Ernte erfolgte die Charakterisierung der Erträge, der Ertragsparameter sowie der Knollenqualität. Der Versuch zeigte eine große Variabilität der ausgewählten Sorten bezüglich ihrer Reaktion auf den Trockenstress. Die Kombination der phänotypischen mit den genotypischen Daten wird zur Entwicklung molekularer Marker beitragen, welche eine gezielte Selektion trockenintoleranter Kartoffelgenotypen ermöglichen.

Stichwörter: Trockentoleranz, Kartoffel, Realtime RT-PCR

Abstract

For the identification and validation of candidate genes for drought tolerance in potatoes, 40 *S. tuberosum* genotypes were evaluated in a pot experiment in a rainout shelter under control and drought stress conditions. Per genotype 24 *in vitro* plants were cultured in 51 pots under control conditions until the start of tuber formation. Thereafter, the plants were subjected to drought stress (20 days no water) or in case of the controls were optimally irrigated. Sampling of leaves in the stressed and control plants allowed the identification of specific components related to drought stress at six different times. Furthermore, about 30 primer pairs for candidate gene expression analysis using real time RT-PCR were developed. After termination of the stress phase the potato genotypes were cultured under control conditions until harvest and were evaluated with regard to phenotypic characteristics. After harvest, yield, yield parameters and tuber quality were characterized. The trial showed a great variation of the selected varieties with respect to their response to drought stress. The combination of the phenotypic and the genotypic data will contribute to the development of molecular markers which allow a targeted selection of drought-tolerant potato genotypes.

Keywords: drought tolerance, potato, realtime RT-PCR

Einleitung

Im Zuge des Klimawandels werden abiotische Stressfaktoren, wie Trockenheit, Hitze und Bodenversalzung, einen immer stärkeren Einfluss auf die Entwicklung von Nahrungspflanzen nehmen. Die Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.), die zu den vier wichtigsten Nahrungspflanzen weltweit zählt, reagiert sehr sensibel auf diese Faktoren, wobei

neben Ertrag und Ertragsstabilität vor allem die Qualität der Knollen beeinflusst wird. Die Kartoffel verfügt über ein relativ schwaches Wurzelsystem und hat für die Ausbildung von Knollen einen sehr hohen Wasserbedarf (Gopal und Iwama, 2007; Watkinson et al. 2008). Eine gezielte züchterische Verbesserung der abiotischen Stresstoleranz bei Kartoffeln kann einen nachhaltigen Beitrag zur Stabilisierung des Anbaus unter ungünstigen klimatischen Bedingungen leisten und somit zur Sicherung des steigenden Nahrungsmittelbedarfs der wachsenden Weltbevölkerung beitragen. Voraussetzung für diese züchterische Arbeit sind Selektionsmethoden und –marker, die einen effizienten Züchtungsfortschritt ermöglichen. Die durch Trockenstress induzierten Änderungen in der Genexpression und den Stoffwechselvorgängen sind sowohl vom physiologischen Zustand der Pflanze selbst, als auch von der Dauer und Intensität des Stresses abhängig (Lahlou et al. 2003). Daraus resultiert die Akkumulation von verschiedenen Metaboliten, wie z.B. Prolin, freien Aminosäuren, Abscisinsäure oder löslichen Zuckern (Seddig und Balko 1998, Doczi et al. 2005), die als Indikatoren für Trockentoleranz verwendet werden können.

Material und Methoden

Ein diverses Sortiment von 40 trocken tolerantanten und sensiblen Kartoffelsorten wurde hinsichtlich der Reaktion auf Trockenstress in einem Gefäßversuch evaluiert. Dazu wurden 24 Pflanzen je Sorte in einem Rain-out Shelter in 51 Töpfen mit einer Erde aus 95 % Weißtorf und 5 % Sand kultiviert. Mit Beginn der Knollenbildung (45 Tage nach Pflanzung) wurde durch das Einstellen der Wassergaben für 20 Tage Trockenstress appliziert, parallel dazu wurden Kontrollpflanzen weiterhin mit 70 % der maximalen Wasserkapazität bewässert. Nach Beendigung der Stressphase wurden die Pflanzen bis zur natürlichen Abreife weiter wie die Kontrollpflanzen bewässert (je nach Sorte 91 bis 140 Tage), um letztendlich die Erträge, Ertragsparameter und Knollenqualität zu vergleichen.

Die Evaluierung umfasste weiterhin die Dokumentation der Umweltbedingungen (Boden- und Lufttemperatur, Wasserverbrauch), die Beschreibung der Pflanzenentwicklung (Größe, Biomasse, Blühbeginn), die Bestimmung von spezifischen Inhaltsstoffen in den Blättern (Proteine, Aminosäuren, Prolin) sowie die Expressionsanalyse von Kandidatengen für Trockentoleranz mittels Realtime RT-PCR. Für diese Bestimmungen wurden jeweils das erste und zweite voll entwickelte Fiederblatt von zwei Pflanzen je Variante zu verschiedenen Zeitpunkten während der Stressphase entnommen, insgesamt waren es sechs Probenahmen (eine vor -, vier während - und eine nach dem Stress). Die Prolinbestimmung erfolgte in Anlehnung an Bates et al. 1973 und die Proteingehalte bzw. Stickstofffraktionen (Seddig & Balko 1998) wurden nass-chemisch nach Kjeldahl bestimmt.

Für die Expressionsanalyse von Trockentoleranz-Kandidatengen wurde zunächst Gesamt-RNA aus gefrorenen Blattproben ausgewählter Sorten zu zwei Stresszeitpunkten (9 und 19 Tage nach Stressbeginn) in Anlehnung an Chomczynski & Sacchi (1987) isoliert. Nach DNaseI-Behandlung wurde cDNA mittels RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverser Transkriptase und Random Hexamer Primern synthetisiert. Genspezifische Primer wurden mittels Primer3 abgeleitet (Rozen & Skaletzky, 2000). Realtime RT-PCR wurde mit dem 7500 Fast System (Applied Biosystems) unter Einsatz des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green durchgeführt.

Ergebnisse und Diskussion

Morphologische und Physiologische Auswirkungen von Trockenstress: Der Versuch zeigte eine große Variation der ausgewählten Sorten in ihrer Reaktion auf den Trockenstress. Nach drei Wochen Stress und erneutem Wässern reichten die Phänotypen von komplett seneszenten bis hin zu vollständig regenerierten Pflanzen (Abbildung 1A-C).

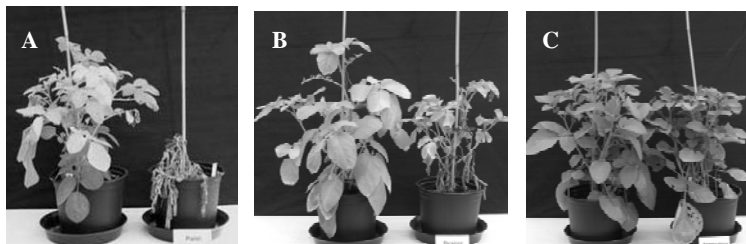


Abb. 1 Erscheinungsbild verschiedener Kartoffelsorten nach Trockenstress und erneutem Wässern

Auch die Ertragsdaten spiegeln die kontrastierenden Stressreaktionen wider, die Ertragsreduktionen reichten dabei von 10 bis 71 %. Die höchsten Erträge unter Stress zeigten die Sorten Aranyalma, Astrid und Arran Banner. Die beste Ertragsstabilität trat bei der Sorte Prof. Wohltmann auf, diese wies allerdings unter Kontrollbedingungen nur geringe Erträge auf (Abbildung 2). Neben den Ertragsreduktionen spielte auch die Änderung in der Verteilung der Knollengrößen eine Rolle. Auch bezüglich der Knollenqualität konnten deutliche Unterschiede zwischen Kontroll- und Stressvarianten beobachtet werden. So kam es zur Reduktion in der Trockenmasse sowie zu Veränderungen in den Gehalten an Protein, freien Aminosäuren, Stärke und Chlorogensäure (nicht gezeigt).

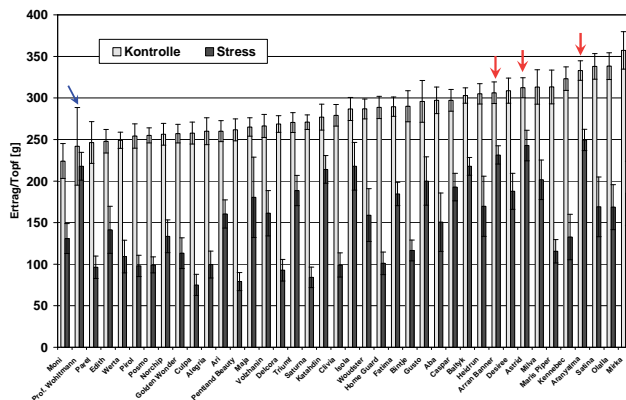


Abb. 2 Einfluss von Trockenstress auf die Knollerträge verschiedener Kartoffelsorten. Rote Pfeile: Sorten mit den besten Stress-Erträgen; blauer Pfeil: Sorte mit dem besten Relativertrag

Weiterhin veränderten sich die Konzentrationen verschiedener Inhaltsstoffe in den Blättern während der Stressphase deutlich. So war beispielsweise der „Stressmarker“ Prolin in Kontrollblättern kaum nachweisbar und in gestressten Blättern stark erhöht (Abbildung 3A). Auch die Konzentration spezifischer Stickstofffraktionen stieg unter Trockenstress an (Abbildung 3B), dabei zeigte sich eine Tendenz für höheren Stickstoffgehalt mit zunehmender Toleranz der Sorten (nicht gezeigt).

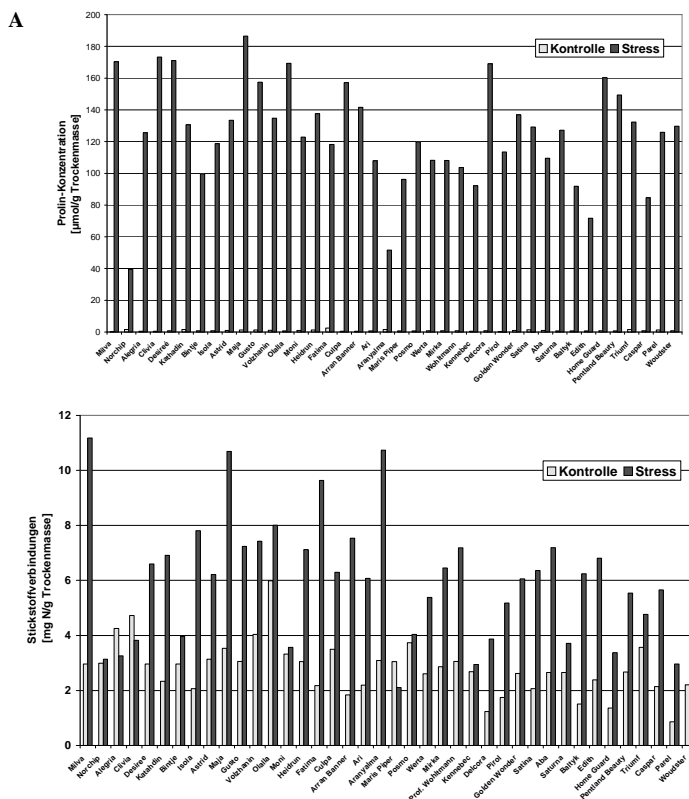


Abb. 3 Konzentration verschiedener Inhaltsstoffe in Blättern von Kontroll- und gestressten Pflanzen. A) Prolingehalt, bestimmt 13 Tage nach Stressbeginn; B) Gehalt spezifischer Stickstofffraktionen, bestimmt 19 Tage nach Stressbeginn

Die in diesem Versuch angewandten Trockenstressbedingungen und untersuchten Merkmale lassen eine gute Einteilung des Kartoffelsortiments in tolerante und sensible Sorten zu und stellen somit ein wichtiges Werkzeug für die Charakterisierung von Trockenstress bei Kartoffeln dar.

Molekularbiologische Untersuchungen: Um die Expressionsänderungen verschiedener Kandidatengene für Trockentoleranz zu untersuchen, wurde zunächst eine Auswahl von Kandidatengenen auf Grundlage von Microarray-Experimenten an Kartoffeln (Rensink et al. 2005; Schafleitner et al. 2007) erstellt. Diese umfasst verschiedenste funktionelle Kategorien, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, ROS-Detoxifizierung oder Signalling. Bisher wurden etwa 50 Kandidatengen-Primerpaare für Realtime RT-PCR-Analysen entwickelt. Nach ersten Test-PCRs mit cDNA und genomischer DNA wurde eine Auswahl dieser Primer in Realtime RT-PCR Pilotexperimenten in der Sorte Desiree optimiert. Die Qualität der Primer wurde analysiert, indem Schmelzkurven und Verdünnungskurven für eine Bestimmung der PCR-Effizienz analog zu Schafleitner et al. (2007) erstellt wurden (Abbildung 4).

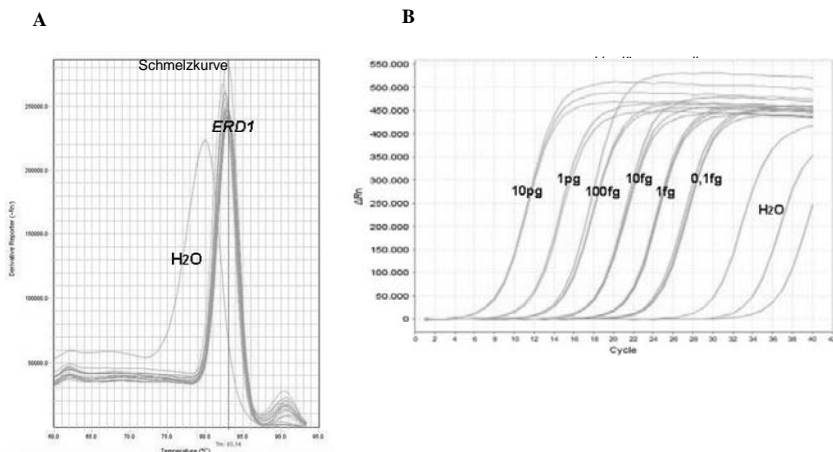


Abb. 4 Beispiele für die Realtime RT-PCR-Primeroptimierung für ein Kandidatengen aus der Kategorie „Signalling“, *ERD1* (*Early Response to Desiccation 1*). A) Schmelzkurven verschiedener PCR-; B) Verdünnungskurven eines exemplarischen aufgereinigten PCR-Fragmentes zur Ermittlung der Primereffizienz.

Für die Expressionsanalysen bei Kartoffeln konnte ein Set an mehr als 30 Primerpaaren etabliert und optimiert werden. Um unterschiedliche Effizienzen bei der cDNA-Synthese auszugleichen, ist die Normalisierung der Transkriptlevel in Kontroll- und Stresspflanzen mit Housekeeping-Genen, die keine bzw. nur geringste Expressionsänderungen zwischen verschiedenen Stressbehandlungen und Genotypen aufweisen, notwendig (Vandesompele et al., 2002). Hierfür wurden verschiedene Housekeeping-Gene getestet und mittels paarweisen Vergleichen nach ihrer Expressionsstabilität klassifiziert (geNorm; Vandesompele et al., 2002). Dabei zeigten sich *EF1a* (Elongationsfaktor 1a) und das cytoplasmatische ribosomale Protein *L2* als die stabilsten Housekeeping-Gene. Das entwickelte Set an Kandidatengenprimern wird nun für ein Screening der kontrastiersten Kartoffelgenotypen eingesetzt. Dabei zeigten sich bereits erste Unterschiede in der Expression zwischen trockentoleranten und sensiblen Sorten, die aber noch weiter untersucht und statistisch validiert werden müssen. Letztendlich wird nach der Untersuchung der Kandidatengene die Kombination der genotypischen mit den phänotypischen Daten zur Entwicklung molekularer Marker beitragen, welche eine gezielte Selektion trockentoleranter Kartoffelgenotypen ermöglichen um die Leistungsfähigkeit dieser wichtigen Nahrungspflanze unter ungünstigen klimatischen Bedingungen zu sichern.

Danksagung: Die vorliegende Arbeit wird angefertigt im Rahmen des GTZ-Projektes „Enhanced food and income security in Southwest and Central Asia (SWCA) through potato varieties with improved tolerance to abiotic stress“ (Projekt-Nr: 07.7860.5-001.00). Die 40 Kartoffelsorten wurden vom Groß Lüsewitzer Kartoffelsortiment der IPK-Genbank zur Verfügung gestellt. Besonderer Dank gilt Frau Schmidt, Frau Kiesel, Frau Weber, Frau Krohn und Frau Kempke für die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und den technischen Arbeiten.

Literatur

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987): Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* **162**:156–159.

- Doczi, R., Kondrak, M., Kovacs, G., Beczner, F., Banfalvi, Z. (2005): Conservation of the drought-inducible *DS2* genes and divergences from their *ASR* paralogues in solanaceous species. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**:269–276.
- Gopal, J., Iwama, K. (2007): In vitro screening of potato against water-stress mediated through sorbitol and polyethylene glycol. *Plant Cell Rep* **26**:693–700.
- Lahlou, O., Ouattar, S., Ledent, J.-F. (2003): The effect of drought and cultivar on growth parameters, yield and yield components of potato. *Agronomie* **23**:257–268.
- Rensink, W., Hart, A., Liu, J., Ouyang, S., Zismann, V., Buell, C.R. (2005): Analyzing the potato abiotic stress transcriptome using expressed sequence tags. *Genome* **48**:598–605.
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000): Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. Totowa, NJ: Humana Press.
- Schafleitner, R., Rosales, R.O.G., Gaudin, A., Aliaga, C.A.A., Martinez, G.N., Marca, L.R.T., Bolivar, L.A., Delgado, F.M., Simon, R., Bonierbale, M. (2007): Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **45**:673–690.
- Seddig, S., Balko, C. (1998): N-metabolism in potatoes under drought stress – conditions and consequences. *Beiträge zur Züchtungsforschung*, **4**(2):175–176
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., Speleman, F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* **3**(7):research0034.I-0034.II.
- Watkinson, J.I., Hendricks, L., Sioson, A.A., Heath, L.S., Bohnert, H.J., Grene, R. (2008): Tuber development phenotypes in adapted and acclimated, drought-stressed *Solanum tuberosum* ssp. *andigena* have distinct expression profiles of genes associated with carbon metabolism. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**:34–45.

Schwander, Florian; Eibach, Rudolf

Julius Kühn-Institut, Institut für Rebenzüchtung Geilweilerhof, Siebeldingen

Neue molekulare Marker für die Rebenzüchtung zur gezielten Pyramidisierung der Resistenz gegenüber dem Falschen Mehltau (*Plasmopara viticola*)

New molecular markers for downy mildew (*Plasmopara viticola*) resistance as a tool for pyramiding resistance genes in grapevine breeding

Zusammenfassung

Molekulare Marker eröffnen neue Möglichkeiten für eine effiziente, zielgerichtete und beschleunigte Züchtung neuer Rebsorten. Von besonderem Interesse sind sie beispielsweise im Hinblick auf die gezielte Kombination verschiedener Abwehrmechanismen in einer Pflanze (Pyramidisierung) zur Etablierung einer hohen und dauerhaften Resistenz. Zu diesem Zweck sollen neue Molekulare Marker für die aus der asiatischen Wildart *Vitis amurensis* stammenden *Plasmopara*-Resistenzmechanismen entwickelt und für die Züchtung nutzbar gemacht werden.

Stichwörter: *Plasmopara viticola*; Resistenzzüchtung; Molekulare Marker; Blattscheibentest

Abstract

Molecular markers are a superior tool to make grapevine breeding more efficient and faster. A matter of particular interest is to identify the combination of different defence mechanisms in one plant to select durable highly resistant plants. For this case we are developing new molecular markers to detect the resistance mechanisms out of the Asian wild type *Vitis amurensis* against downy mildew (*Plasmopara viticola*) to use them in our marker based breeding program.

Keywords: *Plasmopara viticola*; resistance breeding; molecular marker; leaf disc test

Einleitung

Resistenz gegen *Plasmopara viticola*: *Plasmopara viticola*, der Erreger des Falschen Mehltaus an der Rebe, ist eines der Hauptpathogene im europäischen Weinbau. Der pilzliche Erreger aus der Klasse der Oomyceten wurde 1878 von Amerika nach Europa eingeschleppt und nur intensive Pflanzenschutzmaßnahmen können bei den europäischen Rebsorten der Art *Vitis vinifera* hohe Ertrags- und Qualitätseinbußen verhindern. Zwischenzeitlich wurden im Rahmen der Resistenzzüchtung bei Reben neue Sorten mit guten Resistenzeigenschaften gegenüber *P. viticola* entwickelt, die eine deutliche Reduktion der Pilzbekämpfungsmaßnahmen erlauben.

Die Resistenz lässt sich in den meisten Fällen, wie beispielsweise auch bei der neuen Rebsorte 'Regent', auf die Nutzung amerikanischer Wildarten als Resistenzquelle zurückführen. Aus Untersuchungen an einer Kreuzungspopulation zwischen 'Regent' x 'Lemberger' konnten, für die auf diese Resistenzquelle zurückzuführende *Plasmopara*-Resistenz, bereits ein Haupt-QTL (quantitative trait locus) und mehrere resistenzkorrelierende Mikrosatelliten-Marker (SSR-Marker) identifiziert werden (Fischer et al. 2004, Welter et al. 2007, Zyprian et al. 2004).